

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **05-196601**

(43)Date of publication of application : **06.08.1993**

(51)Int.Cl.

G01N 27/416
G01N 33/535

(21)Application number : **04-059758**

(71)Applicant : **WAKO PURE CHEM IND LTD**

(22)Date of filing : **14.02.1992**

(72)Inventor : **SENDA MITSUGI**
YAMAGUCHI NARITAKE

(30)Priority

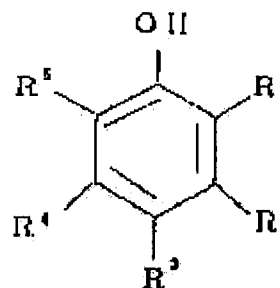
Priority number : **03330033** Priority date : **19.11.1991** Priority country : **JP**

(54) NEW ELECTROCHEMICAL MEASURING METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To perform measurement with high sensitivity by allowing the coexistence of diaphorase and NADH or NADPH in a measurement system, and measuring this electrochemically using aminophenol as a mediator.

CONSTITUTION: Diaphorase and NADH or NADPH are allowed to coexist in a measurement system, and this is electrochemically measured using aminophenol, expressed by a general formula, as a mediator. In the formula, any of R¹, R³ or R⁵ represents an amino group or a lower alkyl group substitution amino group, and others independently represent a hydrogen atom, a lower alkyl group, a lower alkoxy group, or a halogen atom respectively, and R² R⁴ independently represent a hydrogen atom, a lower alkyl group, a lower alkoxy group, or a halogen atom respectively. Any genesis of the diaphorase, from animal, plant or micro-organism may be used. The higher concentration to be used is, the higher the detecting sensitivity of 4-aminophenol becomes. However normally the diaphorase is adequately used so that the concentration in electrolytic liquid becomes 10-10M or more, desirably 10-8M or more, because when the concentration is too high, electrolytic reaction is obstructed. Normally the concentration to be used of NADH or NADPH is adequately selected so that the concentration in electrolytic processing liquid becomes 0.1-100mM, desirably 1-50mM.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-196601

(43) 公開日 平成5年(1993)8月6日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/416				
33/535		8310-2 J		
		7235-2 J	G 0 1 N 27/46	3 3 6 G
		7235-2 J		3 3 6 N

審査請求 未請求 請求項の数6 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平4-59758	(71) 出願人	000252300 和光純薬工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(22) 出願日	平成4年(1992)2月14日	(72) 発明者	千田 貢 京都市左京区上高野北田町15-5
(31) 優先権主張番号	特願平3-330033	(72) 発明者	山口 整毅 滋賀県大津市丸の内町4-15
(32) 優先日	平3(1991)11月19日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 新規な電気化学的測定法

(57) 【要約】

【構成】 測定系にジアホラーゼとNADH (又はNADPH) を共存させ、アミノフェノール類をメディエーターとしてこれを電気化学的に測定することを特徴とする該アミノフェノール類の測定法。

【効果】 本発明は、アミノフェノール類をメディエーターとする、高感度な電気化学的測定法を提供するものであり、本発明方法を利用すれば、高感度な酵素活性測定が可能となるため、酵素免疫測定法や生体試料中の酵素活性測定を効果的に実施する上で寄与するところ極めて大なるものがある。

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-196601

(43)公開日 平成5年(1993)8月6日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/416				
33/535		8310-2 J		
		7235-2 J	G 0 1 N 27/46	3 3 6 G
		7235-2 J		3 3 6 N

審査請求 未請求 請求項の数6 (全 10 頁)

(21)出願番号	特願平4-59758	(71)出願人	000252300 和光純薬工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(22)出願日	平成4年(1992)2月14日	(72)発明者	千田 貢 京都市左京区上高野北田町15-5
(31)優先権主張番号	特願平3-330033	(72)発明者	山口 整毅 滋賀県大津市丸の内町4-15
(32)優先日	平3(1991)11月19日		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

(54)【発明の名称】 新規な電気化学的測定法

(57)【要約】

【構成】 測定系にジアホラーゼとNADH (又はNADPH) を共存させ、アミノフェノール類をメディエーターとしてこれを電気化学的に測定することを特徴とする該アミノフェノール類の測定法。

【効果】 本発明は、アミノフェノール類をメディエーターとする、高感度な電気化学的測定法を提供するものであり、本発明方法を利用すれば、高感度な酵素活性測定が可能となるため、酵素免疫測定法や生体試料中の酵素活性測定を効果的に実施する上で寄与するところ極めて大なるものがある。

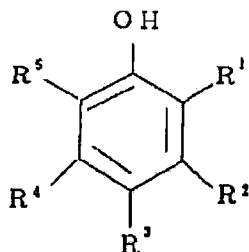
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定系にジアホラーゼとNADH（又はNADPH）を共存させ、一般式[I]

【化1】



[I]

（式中、 R^1 、 R^3 、 R^5 は、何れか一つがアミノ基又は低級アルキル置換アミノ基を表わし、他は夫々独立して水素原子、低級アルキル基、低級アルコキシ基又はハロゲン原子を表わし、 R^2 及び R^4 は夫々独立して水素原子、低級アルキル基、低級アルコキシ基又はハロゲン原子を表わす。）で示されるアミノフェノール類をメディエーターとしてこれを電気化学的に測定することを特徴とする該アミノフェノール類の測定法。

【請求項2】 一般式[I]で示されるアミノフェノール類が酵素反応により生成するアミノフェノール類である請求項1に記載の測定法。

【請求項3】 一般式[I]で示されるアミノフェノール類が、酵素免疫測定法に於て、標識酵素が基質に作用して生ずるアミノフェノール類である請求項2に記載の測定法。

【請求項4】 標識酵素が、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ又は β -ガラクトシダーゼである請求項3に記載の測定法。

【請求項5】 一般式[I]で示されるアミノフェノール類が、生体試料中に存在する酵素が基質に作用して生ずるアミノフェノール類である、請求項2に記載の測定法。

【請求項6】 生体試料中に存在する酵素が、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ又はロイシンアミノペプチダーゼである請求項5に記載の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、例えば酵素免疫測定法や血清中に存在する各種酵素類の酵素活性測定等を利用し得る新規な電気化学的測定法に関する。

【0002】

【発明の背景】酵素免疫測定法は、生体成分の分析、診断、をはじめ多くの分野に於いて、微量成分の測定法として汎用されている。酵素免疫測定法には、例えば固相を用いるヘテロジニアスな方法、ホモジニアスな方法、ホモジニアスな反応後カラムでB/F分離を行う方法等多くの方法が知られているが、いずれの方法に於いて

も、最終的には何らかの方法により酵素活性を測定する必要があり、その為、より高感度な酵素活性測定法が望まれている。酵素活性を高感度に測定することを目的として開発された方法の一つに酵素活性の電気化学的測定法がある。この方法を利用した電気化学的酵素測定法も近時数多く発表されている。

【0003】即ち、酵素反応により生成したフェノールを電気化学的に測定する方法（Clinical Chemistry 31巻、9号、1546～1549頁、1985年；Analytical Chemistry, 58巻、135～139頁、1986年等）、酵素反応により生成した4-アミノフェノールを電気化学的に測定する方法（Analytical Biochemistry, 192巻、90～95頁、1991年；Biosensors, A Practical Approach, 103-107, Oxford University Press 1990等）、酵素反応により生成した1-ナフトールを電気化学的に測定する方法（特開平3-216547号公報等）等がそれぞれである。しかしながら、これらの方法はどれも感度不足であり、そのままでは酵素免疫測定法等の実用には供し得ない。これに対し、感度の高い電気化学的測定法として、フェロセン誘導体やインドール誘導体をメディエーター（酵素反応と電極反応の仲立ちをする物質）としてこれを測定する方法（特開昭62-167465号公報）や、グルコースオキシダーゼを共存させてハイドロキノンやカテコール等をメディエーターとし、これを測定する方法（Biosensors and Bioelectronics, 6巻、305～310頁、1991年；Analytical Chemistry, 57巻、2754～2756頁、1985年等）等がある。また、本発明者らは、NADHとジアホラーゼを共存させてフラビン類やキノン類をメディエーターとし、これを測定することにより、高感度な測定が可能となることを見出し、先に研究発表している（Rev. Polarography, 36巻、38頁、1990年；International Congress on Analytical Sciences, 1991, Abstract, 653頁等）。しかしながら、各種酵素活性の測定に利用し得る4-アミノフェノール等のアミノフェノール類をメディエーターとした電気化学的測定法及びその効果的な増感法について報告された例は未だない。

【0004】

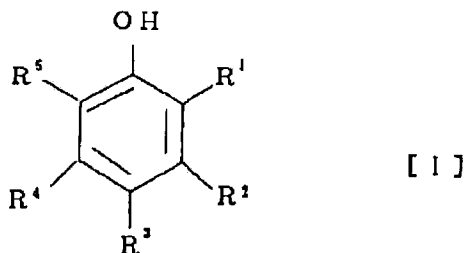
【発明の目的】本発明は上記した如き状況に鑑みなされたもので、4-アミノフェノール等のアミノフェノール類を電気化学的に高感度に測定する方法を提供することを目的とする。

【0005】

【発明の構成】上記目的を達成するため、本発明は下記

3

の構成より成る。「測定系にジアホラーゼとNADH (又はNADPH) を共存させ、一般式[I] 【化2】



(式中、R¹、R²、R³は、何れか一つがアミノ基又は低級アルキル置換アミノ基を表わし、他は夫々独立して水素原子、低級アルキル基、低級アルコキシ基又はハロゲン原子を表わし、R⁴及びR⁵は夫々独立して水素原子、低級アルキル基、低級アルコキシ基又はハロゲン原子を表わす。)で示されるアミノフェノール類をメディエーターとしてこれを電気化学的に測定することを特徴とする該アミノフェノール類の測定法。」

【0006】即ち、本発明者らは、酵素免疫測定法 (EIA) や、血清中に存在する各種酵素の酵素活性測定等に利用し得る、アミノフェノール類の電気化学的測定法に於ける効果的な増感方法を求めて鋭意研究を重ねた結果、測定系にジアホラーゼとNADH (又はNADPH) を共存させてアミノフェノール類をメディエーターとしてこれを測定することにより該目的を達成し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】一般式[I]に於て、R¹～R⁵で表わされる低級アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、アミル基等炭素数1～5のアルキル基 (直鎖状、分枝状何れにても可) が挙げられ、低級アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基、アミロキシ基等炭素数1～5のアルコキシ基 (直鎖状、分枝状何れにても可) が挙げられ、ハロゲン原子としては、塩素、臭素、弗素、沃素が挙げられる。また、R¹、R²、R³は、何れか一つがアミノ基又は低級アルキル置換アミノ基を表わすが、低級アルキル置換アミノ基の低級アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、アミル基等炭素数1～5のアルキル基 (直鎖状、分枝状何れにても可) が挙げられる。

【0008】本発明で用いられるジアホラーゼは、その由来に特に限定はなく、動物、植物、微生物の何れの由来のものにても良い。また、その使用濃度は高いほど4-アミノフェノールの検出感度が高くなるので好ましいが、濃度があまり高いと電解反応が阻害されるおそれがあるので自から上限はあるが、通常は電解処理液中の濃度が10⁻¹⁰M以上、好ましくは10⁻⁸M以上になるように適宜用いられる。尚、ジアホラーゼを電極表面に固定化して用いれば、ジアホラーゼのくり返し使用が可能とな

4

り、ジアホラーゼの使用量を減じることができると共に、使用済のジアホラーゼを廃液中に垂れ流ししなくても済むのでより好ましい。本発明で用いられるNADH又はNADPHの使用濃度は、特に限定されるものではないが、通常は電解処理液中の濃度が0.1～100mM、好ましくは1～50mMになるように適宜選択される。尚、本発明で用いられる電解処理液とは、メディエーターであるアミノフェノール類、又はアミノフェノール類を生成し得る試薬等の組み合わせ (例えば酵素とその基質等) と生成したアミノフェノール類との混合物、NADH (又はNADPH) 及びジアホラーゼを含んで成る水溶液又は緩衝剤溶液のことで、他にMgCl₂等の賦活剤やメルカプトエタノール、ジチオスレイトール等のSH化合物、アルブミン、ゼラチン等の蛋白質、界面活性剤等、各種添加剤を含有していても一向に差支えない。本発明に係る電解処理液に於て用いられる緩衝剤としては、例えばトリス-塩酸緩衝液等のグッド緩衝液、炭酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、リン酸緩衝液、ジエチルアミン緩衝液等が好ましく挙げられるがこれらに限定されるものではない。本発明の測定法を実施する場合に用いられる電解セルは、通常この分野で用いられる何れのタイプ、何れの材質の電解セルでも良く、特に限定されない。また、電極も通常この分野に於て用いられる電極の何れにても良いが、例えば作用電極としてはグラッシーカーボン電極、パイロリテックグラファイト電極、カーボンペースト電極、金電極等が、対極としては白金電極、カーボン電極等が、また参照電極としてはAg/AgCl電極、飽和甘こう電極 (SCE) 等が好ましく用いられる。電流値の測定はポテンシオスタット、ポーラログラフ分析機等通常この分野に於いて用いられる測定機器を用いて行なうことで足りる。本発明の測定法はパッチ法でもフロー法でも何れの方法で行なうも可である。測定温度はジアホラーゼの作用が著しく阻害されない温度であれば何れにても良く、特に限定されるものではないが、通常20～60℃、好ましくは30～40℃の範囲から適宜選択される。また、測定時のpHもジアホラーゼの作用が著しく阻害されないpHであれば何れにても良く特に限定されるものではないが、通常pH5～9の範囲が好ましく用いられる。測定電位はpHによって異なるので特定されないが、例えばpH8.5のときは通常50～400mV、好ましくは100～200mVである。本発明の測定法は、例えば酵素免疫測定法に有効に利用することができる。即ち、酵素免疫測定法に於て、標識酵素の基質として該酵素の作用によりアミノフェノール類を遊離する化合物を用い、酵素反応により遊離したアミノフェノール類の量を本発明の電気化学的測定法により測定すれば該酵素の活性値をより高感度に求めることができ、それによって測定対象たる抗原又は抗体の量をより高感度に測定することができる。尚、キノン類やフラビン類をメディエーターとする系では酵素免疫測定法に利用するのは困難であ

る。

【0009】本発明の方法により測定可能な、酵素免疫測定法に於ける標識酵素とその基質との組み合わせとしては、例えば以下の如きものが挙げられる。

アルカリフォスファターゼ／4（又は2）-アミノフェニルフォスフェイト

酸性フォスファターゼ／4（又は2）-アミノフェニルフォスフェイト

β -ガラクトシダーゼ／4（又は2）-アミノフェニル β -ガラクトピラノシド

また、本発明の測定法は例えば生体試料（血清、血漿、血液等）中に存在する酵素の活性値測定にも有効に利用し得る。即ち、該測定対象酵素の基質として該酵素の作用によりアミノフェノール類を遊離する化合物を基質として用い、酵素反応により遊離したアミノフェノール類の量を本発明の電気化学的測定法により測定すれば、該酵素の活性値をより高感度に求めることができる。本発明の方法により測定可能な生体試料中の酵素と、その基質との組み合わせとしては例えば下記の如きものが挙げられる。

アルカリフォスファターゼ／4（又は2）-アミノフェニルフォスフェイト

酸性フォスファターゼ／4（又は2）-アミノフェニルフォスフェイト

γ -グルタミルトランスベプチダーゼ／ γ -L-グルタミル-4（又は2）-ヒドロキシアニリド

ロイシナミノベプチダーゼ／L-ロイシル-4（又は2）-ヒドロキシアニリド

本発明の方法は上に挙げた以外にも、例えば、各種アミノ酸やペプチド類に一般式[1]で示されるアミノフェノール類がその水酸基又はアミノ基の何れかを介して結合している化合物を基質として用いることにより例えばエンドトキシン、例えばトロンビン、プラスミン、カリクレイン、Xa因子、XIIa因子等の血液凝固因子等を始めとして、各種プロテアーゼ類、エステラーゼ類の活性値を高感度に測定することができる。

【0010】本発明の測定法は、電解処理液中にNADH（又はNADPH）とジアホラーゼとを共存させてアミノフェノール類をメディエーターとしてこれを測定する以外は、4-アミノフェノールを測定対象とする自体公知の電気化学的測定法の操作法に準じてこれを行なうことで足りる。即ち、例えば4-アミノフェノールそのものが最終測定対象物の場合には、電解セル（作用電極として例えばグラッシーカーボン電極、対極として例えば白金電極、参照電極として例えばAg/AgCl電極を使用）に適当な緩衝液と所定量のNADH（又はNADPH）水溶液及び所定量のジアホラーゼ溶液を加えて一定時間攪拌後、所定電位（例えばAg/AgCl電極に対して150mV）に於ける電流が定常値を示すことを確認した後、試料（4-アミノフェノールを含む）溶液を添

加し、再度一定時間攪拌し、然る後、同じ電位に於ける酸化電流を測定する。この値を予め4-アミノフェノール濃度既知の試料を用いて同様の操作を行ない作成した検量線に当て嵌めれば未知試料中の4-アミノフェノール含量が容易に求められる。

【0011】また、本発明の方法により例えばアルカリフォスファターゼの活性値を求めようとする場合には、例えば4-アミノフェニルフォスフェイト及び要すれば賦活剤のMgCl₂を含む緩衝溶液（例えばpH10.3の炭酸緩衝液）に試料（アルカリフォスファターゼ含有）を37℃で添加し、一定時間要すれば攪拌下に反応させた後、反応液の一定量を取り出し、これを試料として上記方法（4-アミノフェノールそのものが最終測定対象物の場合の測定方法）に準じて酸化電流値を求め、この値を予めアルカリフォスファターゼ活性値既知の試料を用いて同様の操作を行ない作成した検量線に当て嵌めれば未知試料中のアルカリフォスファターゼ活性値が容易に求められる。尚、本発明の方法によりアルカリフォスファターゼ活性を測定した場合には、検出限界が 8×10^{-15} Mであり、例えばフェロセンをメディエーターとした場合のアルカリフォスファターゼの検出限界である 10^{-12} M（特開昭62-167465号公報のFig. 2より）と比べて約2桁感度が高い。以下に、実験例及び実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実験例、実施例により何ら限定されるものではない。

【0012】

【実施例】

実験例1. 4-アミノフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラムの作成

4-アミノフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラムの4-アミノフェノールだけの場合、NADHを添加した場合、及びジアホラーゼとNADHの両方を添加した場合の夫々について作成し比較した。

〈測定装置〉

電解セル：アクリル製H型セル（容量0.4ml）

作用電極：グラッシーカーボンディスク電極（ $\phi=0.3$ cm）

（電極表面は常法に従い研磨、超音波処理して使用）

対極：白金電極

参照電極：Ag/AgCl（飽和KCl溶液）電極

Yanaco ポーラログラフィ分析機 P-1000、
〔株〕柳本製作所製〕（横河電機（株）製3025型 X-Yレコーダー接続）

〈方法〉 4×10^{-4} Mの4-アミノフェノールを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH8.5）と、これに0.1MのNADHを添加したもの、及び 3.3×10^{-6} Mのジアホラーゼと0.1MのNADHとを添加したものを夫々試料とした。これら試料の夫々について、上記測定装置を用い常法に従い、 $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 、除酸素下、掃引速度10mV/秒

(-0.2Vより正方向に掃引)でサイクリックボルタメトリーを行ないボルタモグラムを作成した。結果を図1に示す。図1から明らかなように、ジアホラーゼ、NADH共に無添加の場合(a)及びNADHのみ添加の場合(b)に比べ、ジアホラーゼとNADHの両方を添加した場合(c)にはアノードック電流が大幅に増加していることが判る。

【0013】実験例2. 2-アミノフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラムの作成

2-アミノフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラムを2-アミノフェノールだけの場合、及びジアホラーゼとNADHを添加した場合の夫々について作成し比較した。

〈測定装置〉実験例1と同じ。

〈方法〉 2×10^{-4} Mの2-アミノフェノールと0.1MのKClを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、及びこれに1mMのNADH及び 10^{-7} Mのジアホラーゼを添加したものを夫々試料とした。これら試料の夫々について、上記測定装置を用い常法に従い、 $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 、除酸素下、掃引速度5mV/秒(-0.1Vより正方向に掃引)でサイクリックボルタメトリーを行ないボルタモグラムを作成した。結果を図2に示す。図2から明らかなように、ジアホラーゼ及びNADH無添加の場合(a)に比べ、ジアホラーゼとNADHを添加した場合(b)にはアノードック電流が大幅に増加していることが判る。

【0014】実験例3. 2-アミノ-4-メチルフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラムの作成

2-アミノ-4-メチルフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラムを2-アミノ-4-メチルフェノールだけの場合、及びジアホラーゼとNADHを添加した場合の夫々について作成し比較した。

〈測定装置〉実験例1と同じ。

〈方法〉 2×10^{-4} Mの2-アミノ-4-メチルフェノールと0.1MのKClを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、及びこれに1mMのNADH及び 10^{-7} Mのジアホラーゼを添加したものを夫々試料とした。これら試料の夫々について、上記測定装置を用い常法に従い、 $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 、除酸素下、掃引速度5mV/秒(-0.1Vより正方向に掃引)でサイクリックボルタメトリーを行ないボルタモグラムを作成した。結果を図3に示す。図3から明らかなように、ジアホラーゼ及びNADH無添加の場合(a)に比べ、ジアホラーゼとNADHを添加した場合(b)にはアノードック電流が大幅に増加していることが判る。

【0015】実験例4 p-メチルアミノフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラ

ムの作成

p-メチルアミノフェノールをメディエーターとする系でのサイクリックボルタモグラムを、p-メチルアミノフェノールだけの場合、NADHを添加した場合、及びジアホラーゼとNADHの両方を添加した場合の夫々について作成し比較とした。

〈測定装置〉実験例1と同じ。

〈方法〉 1×10^{-4} Mのp-メチルアミノフェノールを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) と、これに10mMのNADHを添加したもの、及び 4×10^{-7} Mのジアホラーゼと10mMのNADHとを添加したものを夫々試料とした。これら試料の夫々について、上記測定装置を用い常法に従い、 $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 、除酸素下、掃引速度5mV/秒(-0.2Vより正方向に掃引)でサイクリックボルタメトリーを行ないボルタモグラムを作成した。結果を図4に示す。図4から明らかなように、ジアホラーゼ、NADH共に無添加の場合(a)及びNADHのみ添加の場合(b)に比べ、ジアホラーゼとNADHの両方を添加した場合(c)にはアノードック電流が大幅に増加していることが判る。

【0016】実験例5. ジアホラーゼ濃度の影響

〈測定装置〉実験例1と同じ。

〈方法〉0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) を用いて 10^{-5} M 4-アミノフェノール 溶液と0.1M NADH溶液を夫々調製した。また、同じ緩衝液を用いて 3×10^{-8} M, 7.5×10^{-9} M, 1.9×10^{-9} M, 4.7×10^{-10} Mのジアホラーゼ溶液を夫々調製した。電解セルに0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) 385 μ lと上記NADH溶液5 μ l及び上記各ジアホラーゼ溶液5 μ lを注入し、数秒間攪拌した後、+0.15Vに於ける電流が定常値を示すことを確認し、然る後これに上記4-アミノフェノール溶液5 μ lを加えて、常法に従い、除酸素下、 $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$ で夫々電気化学反応を行ない、0.15Vに於ける酸化電流量を夫々測定した。結果を図5に示す。図5より明かなように、ジアホラーゼ濃度の平方根に比例して電流量が増加していることが判る。

【0017】実施例1. 4-アミノフェノールの測定 (検量線の作成)

〈測定装置〉実験例1と同じ。

〈方法〉電解セルに0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) 382 μ lと 3.3×10^{-6} M又は 3.3×10^{-4} Mのジアホラーゼ溶液 (1%牛血清アルブミン (BSA) 溶液) 4 μ l及び0.1M NADH水溶液4 μ lを注入し、数秒間攪拌した後、これに各種濃度の4-アミノフェノール10 μ lを添加して、常法に従い、除酸素下、 $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$ で夫々電気化学反応を行ない、0.15Vに於ける酸化電流量を夫々測定した。結果を図6 (3.3×10^{-6} Mのジアホラーゼ溶液使用の場合)及び図7 (3.3×10^{-4} Mのジアホラーゼ溶液使用の場合)に示す。図6及び図7より明かなように、4-アミノフェノール濃度と生じた電流量との関係

を示す検量線は原点を通る直線となり、本発明の方法が定量性に優れていることが判る。また、本実験結果から、電解処理液中に 3.3×10^{-6} Mのジアホラーゼが存在した場合、少なくとも 5×10^{-10} Mまでの4-アミノフェノールが検出可能であることが判った。

【0018】実施例2. アルカリフォスファターゼ活性の測定

〈測定装置〉実験例1と同じ。

〈方法〉各種単位のアリカリフォスファターゼを含む試料溶液1 μ lを0.25mMの $MgCl_2$ と0.1Mの4-アミノフェニルフォスフェイトを含有する炭酸緩衝液 (pH10.3) 49 μ lに添加し、37℃で10分間反応させた。この反応液10 μ lを試料とし、以下、実施例1の方法に準じて、0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) 382 μ l、 3.3×10^{-4} Mのジアホラーゼ 4 μ l及び0.1M NADH 4 μ lを用いて電気化学反応を行ない、0.15Vで生じる酸化電流量を夫々測定した。結果を図8に示す。図8より明かなように、アルカリフォスファターゼ活性値と生じた電流量との関係を示す検量線は原点を通る直線となり、本発明の方法が定量性に優れていることが判る。また、本実験結果から、電解処理液中に 3.3×10^{-6} Mのジアホラーゼが存在した場合のアリカリフォスファターゼの検出限界は 10^{-7} unit (4×10^{-10} mol/50 μ l) = 8×10^{-15} M)であることが判った。

【0019】実施例3. β -ガラクトシダーゼ活性の測定

〈測定装置〉実験例1と同じ。

〈方法〉各種濃度の β -ガラクトシダーゼを含む0.1%アルブミン溶液10 μ lと、30mM 4-アミノフェニル β -D-ガラクトピラノシドを含む基質溶液10 μ lとを3 mM $MgCl_2$ と0.1%アルブミンを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.3) 280 μ lに添加し、37℃で10分間反応させた。その後、反応液を限外濾過し(ミリポア社、UFP2、LGC24、分画分子量 10,000)、酵素反応を停止させた。この濾液10 μ lを試料とし、以下実施例1の方法に準じて0.1M KClを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) 880 μ l、 2.3×10^{-6} Mのジアホラーゼ10 μ l及び10 mM NADH100 μ lを用いて電気化学反応を行ない、0.15Vで生じる酸化電流量を夫々測定した。結果を図9に示す。図9より明かなように、 β -ガラクトシダーゼ濃度と生じた電流量との関係を示す検量線は原点を通る直線となり、本発明の方法が定量性に優れていることが判る。また、本実験結果から、電解処理液中に 2.3×10^{-6} Mのジアホラーゼが存在した場合の β -ガラクトシダーゼの検出限界はこの測定条件で 3.6×10^{-16} mol/0.3 ml = 1.2×10^{-12} Mであることが判った。

【0020】
【発明の効果】本発明は、アミノフェノール類をメディエーターとする、高感度な電気化学的測定法を提供するものであり、本発明方法を利用すれば、高感度な酵素活性測定が可能となるため、酵素免疫測定法や生体試料中の酵素活性測定を効果的に実施する上で寄与するところ極めて大なるものがある。

【0021】

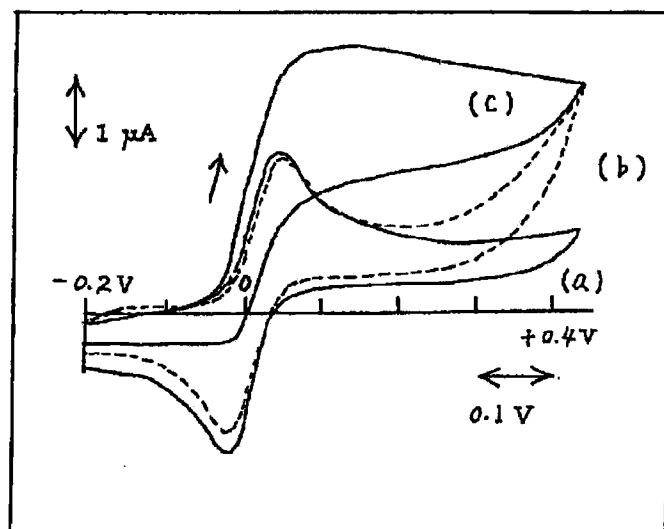
【図面の簡単な説明】
【図1】図1は実験例1で得られたサイクリックボルタモグラムを示す。
【図2】図2は実験例2で得られたサイクリックボルタモグラムを示す。
【図3】図3は実験例3で得られたサイクリックボルタモグラムを示す。
【図4】図4は実験例4で得られたサイクリックボルタモグラムを示す。
【図5】図5は実験例5で得られた、ジアホラーゼ濃度と酸化電流量との関係を示すグラフである。
【図6】図6は実施例1で得られた、ジアホラーゼ濃度 3.3×10^{-6} Mの場合の検量線を示す。
【図7】図7は実施例1で得られた、ジアホラーゼ濃度 3.3×10^{-6} Mの場合の検量線を示す。
【図8】図8は実施例2で得られた検量線を示す。
【図9】図9は実施例3で得られた検量線を示す。

【0022】

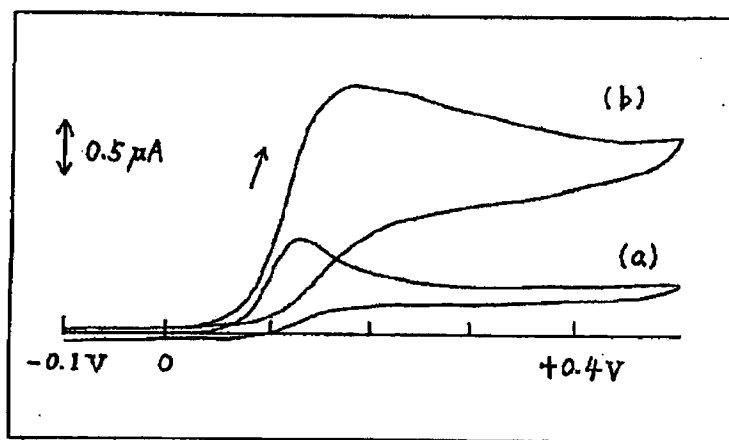
【符号の説明】

図1に於て(a)は4-アミノフェノールのみの場合の、(b)はこれにNADHを添加した場合の、また(c)はジアホラーゼとNADHの両方を添加した場合のサイクックボルタモグラムを夫々示す。図2に於て(a)は2-アミノフェノールのみの場合の、(b)はこれにジアホラーゼとNADHを添加した場合のサイクリックボルタモグラムを夫々示す。図3に於て(a)は2-アミノ-4-メチルフェノールのみの場合の、(b)はこれにジアホラーゼとNADHを添加した場合のサイクリックボルタモグラムを夫々示す。図4に於て(a)はp-メチルアミノフェノールのみの場合の、(b)はこれにNADHを添加した場合の、また(c)はジアホラーゼとNADHの両方を添加した場合のサイクックボルタモグラムを夫々示す。

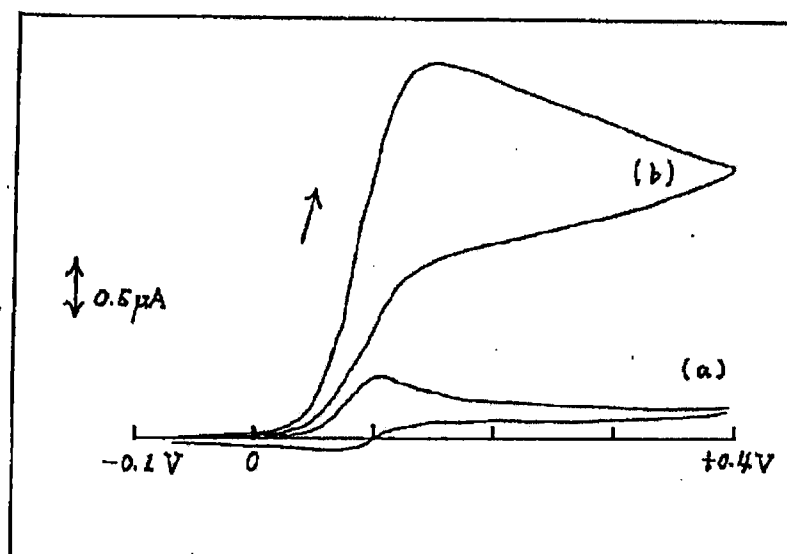
【図1】



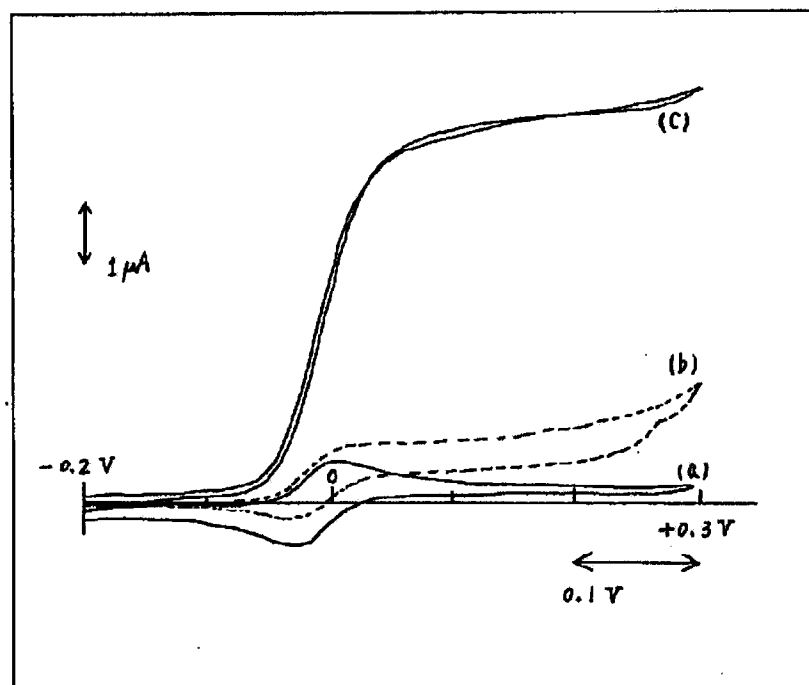
【図2】



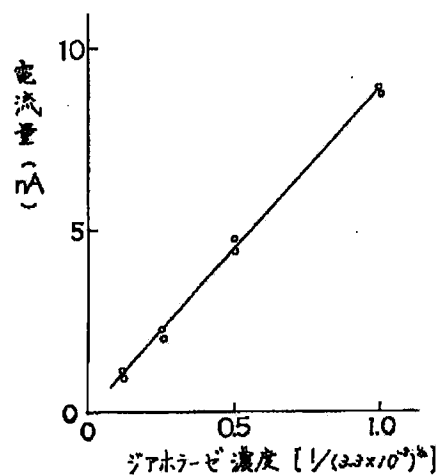
【図3】



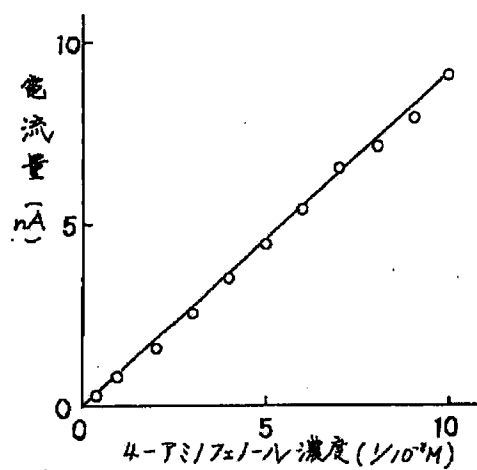
【図4】



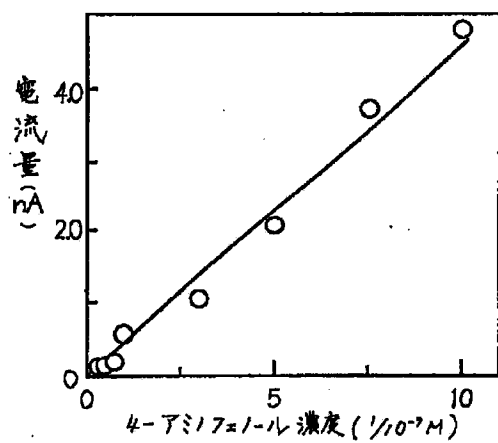
【図5】



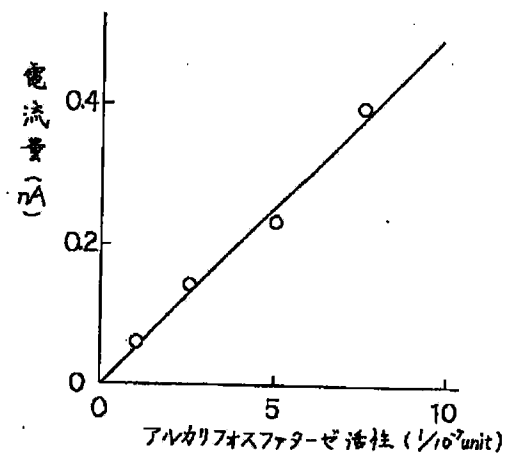
【図6】



【図7】



【図8】



【図9】

